

PAT-NO: JP408114575A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08114575 A
TITLE: ANALYZING METHOD FOR L TYPE
AND D TYPE AMINO ACID
PUBN-DATE: May 7, 1996

INVENTOR-INFORMATION:
NAME

KAWAMATA, MUTSUMI

OBA, MIHO

INT-CL (IPC): G01N027/447, G01N033/68

ABSTRACT:

PURPOSE: To make it possible to analyze L type and D type amino acid effectively by conducting capillary electrophoresis using specified carrier buffer solution containing phosphate buffer solution or the like.

CONSTITUTION: Carrier buffer solution contains 30 to 100mM of phosphate buffer solution, 50 to 150mM of β -cyclodextrin, 3 to 6M of urea, and 50 to 100mM of sodium dodecyl sulfate (SDS), and its pH is set to 6.0 to 8.0. The conditions of capillary electrophoresis are, for example, detection wavelength of 185 to 220nm, applied voltage of 8 to 30kV, and

capillary effective length
of 75 to 100 μ m \times 30 to 100cm, and sample
injection is performed by a
weighing method (for 60 seconds). In a CE system
portion S, both ends of a
hollow capillary 1 are soaked in jars of carrier
buffer solution 2, the inside
of the capillary 1 is filled fully with the carrier
buffer solution 2, and
electrodes 3 are connected to both end jars of the
carrier buffer solution 2
with a high voltage power supply V so as to detect
by a detector 4.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-114575

(43) 公開日 平成8年(1996)5月7日

(51) Int.Cl.⁶G 0 1 N 27/447
33/68

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 27/ 26

3 0 1 A

3 3 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-251026

(22) 出願日 平成6年(1994)10月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年10月1日～
10月4日、社団法人日本水産学会主催の「平成6年度日
本水産学会秋季大会」において文書をもって発表

(71) 出願人 000206211

大成建設株式会社

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号

(72) 発明者 川又 睦

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成
建設株式会社内

(72) 発明者 大場 美保

東京都新宿区西新宿一丁目25番1号 大成
建設株式会社内

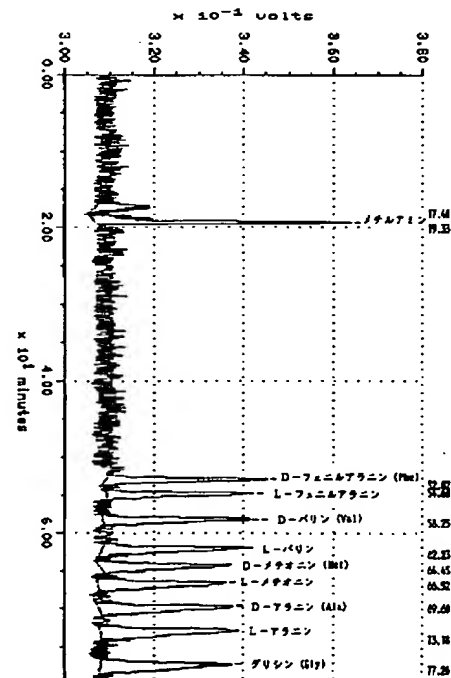
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 L型およびD型アミノ酸の分析法

(57) 【要約】

【構成】 リン酸塩緩衝液、 β -サイクロデキストリン、尿素、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むキャリア緩衝液を用いたキャピラリー電気泳動によるフェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンを含むL型およびD型アミノ酸の分析法。

【効果】 本発明の方法は、食品や医薬品の製造分野で生じるアミノ酸の光学分割に適用できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン酸塩緩衝液、 β -サイクロデキストリン、尿素、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むキャリア緩衝液を用いたキャピラリー電気泳動によるL型およびD型アミノ酸の分析法。

【請求項2】 アミノ酸がフェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンを含むことを特徴とする、請求項1記載の分析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、キャピラリー電気泳動によるL型およびD型アミノ酸の分析法に関する。

【0002】

【従来の技術】アミノ酸を合成すると、L型とD型が等量ずつ生成されるが、通常必要とされるのはL型である。食品や医薬品製造分野では合成したアミノ酸 (L型とD型の混合物) をさらに分離してL型のみを抽出しなければならない。従来、アミノ酸の光学分割 (L型とD型を分離すること) には、ガスクロマトグラフィー (GC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などが用いられてきたが、分離性能が低い上に試料を多量に必要とした。また、専用の分離カラムを使用する必要があるため操作が煩雑で、分析に要するコストも比較的高い等の欠点が見られた。これらの欠点を補う分析技術として最近、キャピラリー電気泳動装置を用いたアミノ酸の分析法が検討されている。例えば、100mM ホウ酸塩緩衝液、60mM β -サイクロデキストリン、100mM SDS (pH8.3) からなるキャリア緩衝液を用いたフェニルアラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、グルタミン酸の分析 (寺部茂、「キャピラリー電気泳動 - 原理と応用 -」、生化学、Vol. 64, No. 2, pp. 111-115, 1992)、50mMリン酸塩緩衝液、数〜数十mM 光学活性デタージェント、数〜数十mM SDS からなるキャリア緩衝液を用いたバリン、メチオニン、ノルバリン、ロイシン、ノルロイシン、トリプトファンの分析 (三村典行、満野千加子、伊藤裕子、木下俊夫、花井俊彦、「光学活性デタージェントを用いるキャピラリー-MEKCによる光学分割」、第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム、pp. 45-46、1992)、20mMリン酸塩緩衝液、20% メタノール、100mM β -サイクロデキストリン、5M尿素、60mM SDSからなるキャリア緩衝液を用いたロイシンの分析 (「キャピラリー電気泳動基礎概論」、p. 35、ウォーターズクロマトグラフィー事業部、日本ミリポアリミテッド発行) 等がそれぞれ報告される。これらはいずれもそれぞれの分析条件の違いによって、分解可能なアミノ酸が限られている。これらの報告例において、検出波長、印加電圧、キャピラリー有効長、試料注入法に大きな差異は見られないが、キャリア緩衝液に関しては種々の成分が使用されており、それらがL型アミノ酸とD型アミノ酸の分離に及ぼす影響が大きいことが示唆される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、キャリア緩衝液の組成を検討することにより、特定のアミノ酸に有効な、新規なL型およびD型アミノ酸の分析法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、今までに報告されていない分析条件で特定のアミノ酸のL型およびD型を良好に分析する方法を開発し、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、リン酸塩緩衝液、 β -サイクロデキストリン、尿素、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むキャリア緩衝液を用いたキャピラリー電気泳動による、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンを含むL型およびD型アミノ酸の分析法である。

【0006】本発明に用いるキャリア緩衝液は、30〜100mM、好ましくは50mMのリン酸塩緩衝液、50〜150mM、好ましくは100mMの β -サイクロデキストリン、3〜6M、好ましくは5Mの尿素、50〜100mM、好ましくは75〜95mM、さらに好ましくは85mMのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含み、pHは6.0〜8.0、好ましくは7.0である。

【0007】本発明におけるキャピラリー電気泳動の条件は、検出波長185〜220nm、印加電圧8〜30kV、キャピラリー有効長75〜100 μ m \times 30〜100cmが例示され、試料注入は重量法 (60秒間) にて行う。

【0008】本発明に用いるキャピラリー電気泳動 (CE) の装置として図1の構成が例示できる。該装置はCEシステム部 (S)、データ解析装置 (D)、プリンター (P) から構成される。CEシステム部においては、中空キャピラリー (1) の両端をキャリア緩衝液 (2) の瓶に浸し、キャピラリー内をキャリア緩衝液で満しており、両端のキャリア緩衝液の瓶に高電圧パワーサプライ (V) にて接続した電極 (3)、さらにキャピラリーの一方の端近くにオンライン検出器 (4) が取り付けられている。キャピラリー電気泳動 (CE) の装置としては、市販のウォーターズ クォンタTM 4000 CE システム (Millipore製)、ベックマンP/ACE System 200 (Beckman製)、CE-800 (日本分光製)、CES (日本ダイオネクス製) 等が好適に使用される。

【0009】

【発明の効果】本発明によれば、特定のアミノ酸のL型およびD型を極めて良好に、かつ簡便に分析することができるので、食品や医薬品の製造分野で生じるアミノ酸の光学分割に適用できる。

【0010】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を何等限定するものではない。

〔実施例1〕 アミノ酸の分析

下記の分析条件により、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンを含む標品についてウォーターズ クォンタTM 4000CE システム (Millipore製) を用いてキャピラリー電気泳動を行った。

・キャリア緩衝液: 50mMリン酸塩緩衝液/100mM β-サイクロデキストリン/5M 尿素、85mM SDS (pH7.0)

・検出波長: 214 nm

・印加電圧: 20kV

・キャピラリー有効長: 75μm×52.5cm

・試料注入法: 重力法 (60秒間)

【0011】図2に示す如く、フェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンのD型、L型に対応する極めて明確な8本のピークを検出することができた。尚、試薬の組成上出現するメチルアミン、DL型の区別のないグリシンについてもピークを確認できた。

【0012】〔比較例〕キャリア緩衝液として以下のものを使用する以外は、実施例1と同様な条件でフェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンを含む標品についてキャピラリー電気泳動を行った。

① キャリア緩衝液: 100mM ホウ酸塩緩衝液、60mM α-サイクロデキストリン、100mM SDS (pH8.3)

② キャリア緩衝液: 50mMリン酸塩緩衝液、15mM 光学活性デタージェント(オクチル-β-D-チオグルコシド)、20mM SDS (pH7.0)

③ キャリア緩衝液: 20mMリン酸塩緩衝液、20% メタノール、100mM β-サイクロデキストリン、5M尿素、60mM SDS (pH7.0)

①、②、③のキャリア緩衝液を使用した場合の分析結果を図3、図4、図5にそれぞれ示した。各分析結果より明らかなように、ピークが出ていても分離が悪かったり(図3)、分離が全く不能であったり(図4)、ピーク数が足らなかったり(図5)していずれも上記のアミノ酸の分析には不適當であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に用いるキャピラリー電気泳動の装置の一例を示す。

10 【図2】 本願発明に係るキャリア緩衝液によるフェニルアラニン、バリン、メチオニン、アラニンのLおよびD型のアミノ酸分析結果を示す。

【図3】 キャリア緩衝液(①)による同アミノ酸分析結果を示す。

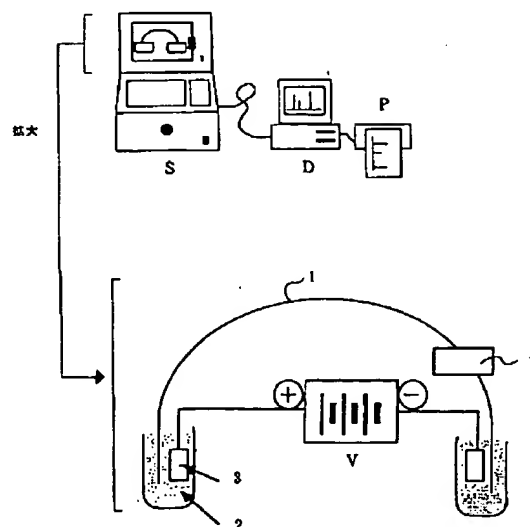
【図4】 キャリア緩衝液(②)による同アミノ酸分析結果を示す。

【図5】 キャリア緩衝液(③)による同アミノ酸分析結果を示す。

【符号の説明】

- 20 1: 中空キャピラリー
2: キャリア緩衝液
3: 電極
4: オンライン検出器
S: CEシステム部
D: データ解析装置
P: プリンター
V: 高電圧パワーサプライ

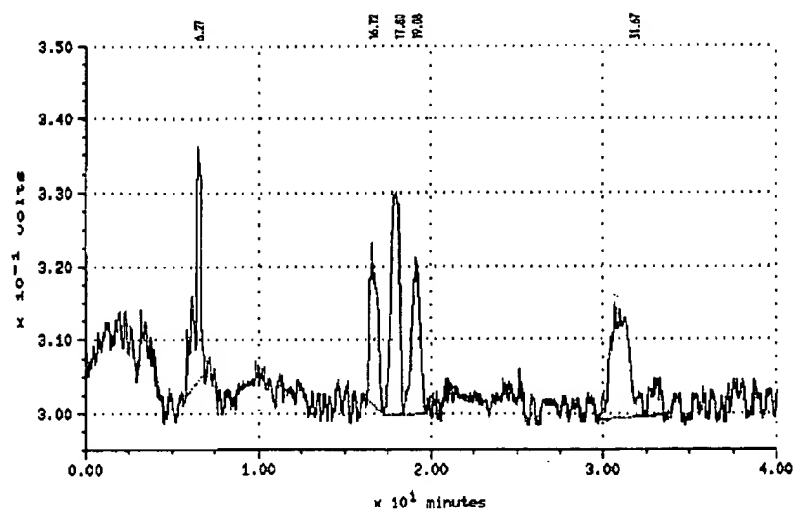
【図1】



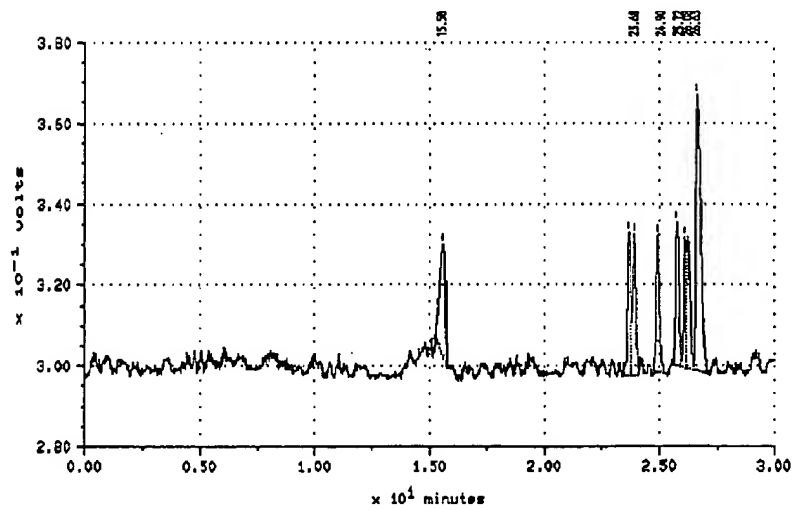
特開平8-114575

Chromatogram of the sample after 10 minutes of irradiation. The x-axis is labeled $\times 10^4$ minutes and ranges from 0.00 to 3.00. The y-axis is labeled $\times 10^{-1}$ and ranges from 3.00 to 3.50. The chromatogram shows a baseline with several sharp peaks. The peaks are labeled with their retention times: 1.52, 1.63, 1.72, 1.82, 1.91, 2.01, 2.15, and 2.25. The peak at 1.63 is the highest, reaching approximately 3.48 on the y-axis.

【図4】



【図5】



Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The analysis method of the L type by the capillary-tube electrophoresis using the phosphate buffer solution, beta-cyclodextrin, a urea, and the carrier buffer solution containing a sodium dodecyl sulfate (SDS), and D type amino acid.

[Claim 2] The analysis method according to claim 1 characterized by amino acid containing a phenylalanine, a valine, a methionine, and an alanine.

[Translation done.]

JP 8-114575

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to the analysis method of the L type by capillary-tube electrophoresis, and D type amino acid.

[0002]

[Description of the Prior Art] If amino acid is compounded, although an L type and D type will be generated equivalent [every], an L type is usually needed. In food or a drug manufacture field, the compound amino acid (mixture of an L type and D type) must be separated further, and only an L type must be extracted. Although the gas chromatography (GC), the high performance chromatography (HPLC), etc. had been conventionally used for the optical resolution (separate an L type and D type) of amino acid, separability ability needed the sample on the low at the large quantity. Moreover, a fault, like since it is necessary to use the separation column of exclusive use, operation is complicated, and the cost which analysis takes is also comparatively high was seen. The analysis method of the amino acid using the capillary-tube electrophoresis apparatus as analysis technology with which these faults are compensated is examined recently. For example, 100mM The borate buffer solution, a 60mM gamma-cyclodextrin, 100mM SDSs (pH 8.3) from -- the phenylalanine using the becoming carrier buffer solution -- analysis (the Terabe **** "a capillary-tube electrophoresis -principle and application -" --) of a valine, a leucine, a methionine, and glutamic acid Biochemistry, Vol.64, No.2, pp.111-115, and 1992, 50mM phosphate buffer-solution and number - dozens mM(s) an optical-activity detergent -- number - dozens mM(s) SDS from -- the valine using the becoming carrier buffer solution -- analysis (Noriyuki Mimura --) of a methionine, a norvaline, a leucine, a norleucine, and a tryptophan **** Chikako, Yuuko Itou, Toshio Kinoshita, Toshihiko Hanai, "the optical resolution by the capillary tube MEKC using an optical-activity detergent", the 12th capillary-tube electrophoresis symposium and pp.45- 46 and 1992 -- 20mM phosphate buffer solution and 20% A methanol, a 100mM beta-cyclodextrin, Analysis ("capillary-tube electrophoresis basic introduction", p.35, the Waters chromatography operation division, the Nihon Millipore Limited issue) of the leucine using 5M urea and the carrier buffer solution which consists of 60mM SDS etc. is reported, respectively. As for each of these, the amino acid which can be decomposed is restricted by the difference in each analysis condition. In these examples of a report, although the big difference by detection wavelength, applied voltage, capillary-tube effective length, and the sample pouring-in method is not seen, various components are used about the carrier buffer solution, and it is suggested that the influence they affect separation of L type amino acid and D type amino acid is large.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The technical problem of this invention is by considering composition of the carrier buffer solution to offer the analysis method of a new L type and D type amino acid effective in specific amino acid.

[0004]

[Means for Solving the Problem] This invention persons developed the method of analyzing the specific L type and specific D type of amino acid good on the analysis conditions which are not reported until now as a result of repeating research wholeheartedly the above-mentioned technical problem being solved, and completed this invention.

[0005] That is, this invention is the analysis method of the L type containing a phenylalanine, a valine, a methionine, and an alanine by the capillary-tube electrophoresis using the phosphate buffer solution, beta-cyclodextrin, a urea, and the carrier buffer solution containing a sodium dodecyl sulfate (SDS), and D type amino acid.

[0006] the carrier buffer solution used for this invention -- 30-100mM -- desirable -- the phosphate buffer solution of 50mM(s), and 50-150mM -- desirable -- beta-cyclodextrin of 100mM(s), and 3-6M -- desirable -- 5M a urea and 50-100mM -- desirable -- 75-95mM -- further -- desirable -- the sodium dodecyl sulfate (SDS) of 85mM(s) -- containing -- pH -- 6.0-8.0 -- it is 7.0 preferably

[0007] As for the conditions of the capillary-tube electrophoresis in this invention, the detection wavelength of 185-220nm, the applied voltage of 8-30kV, and capillary-tube effective length 75-100micrometerx30-100cm are illustrated, and sample pouring is a weight method (for 60 seconds). It carries out.

[0008] The composition of drawing 1 can be illustrated as equipment of capillary-tube electrophoresis (CE) used for this invention. This equipment consists of the CE system section (S), data analysis equipment (D), and a printer (P). In CE system section, the ends of a hollow capillary tube (1) are dipped in the bottle of the carrier buffer solution (2), the inside of a capillary tube is filled with the carrier buffer solution, and the online detector (4) is attached in the electrode (3) and pan which were connected to the bottle of the carrier buffer solution of ends by the high-voltage power supply (V) near [one] the edge of a capillary tube. As equipment of capillary-tube electrophoresis (CE), it is commercial Waters. KUONTA TM 4000CE A system (product made from Millipore), Beckmann P/ACE System 200 (product made from Bechman), and CE-800 (Japan a spectrum make) CES (Nippon Daionekusu make) etc. is used suitably.

[0009]

[Effect of the Invention] According to this invention, since the specific L type and specific D type of amino acid can be analyzed very good and simple, it is applicable to the optical resolution of the amino acid produced in the manufacture field of food or a drug.

[0010]

[Example] Although an example is given and this invention is explained still in detail hereafter, these examples do not limit the range of this invention at all.

[Example 1] It is Waters about the preparation which contains a phenylalanine, a valine, a methionine, and an alanine according to the analysis

conditions of the analysis following of amino acid. KUONTA TM 4000CE System (product made from Millipore) It used and capillary-tube electrophoresis was performed.

Carrier buffer solution : 50mM phosphate buffer solution / 100mM beta-cyclodextrin / 5M A urea, 85mM SDS, detection wavelength:214 nm and applied voltage: 20kV and capillary-tube effective length:75-micrometerx52.5cm and, the sample pouring-in method: Gravitational method (for 60 seconds) [0011] As shown in drawing 2 , eight very clear peaks corresponding to D type of a phenylalanine, a valine, a methionine, and an alanine and an L type were detectable. In addition, the peak has been checked also about the monomethylamine which appears on composition of a reagent, and the glycine without a DL type distinction.

[0012] [Example of comparison] Capillary-tube electrophoresis was performed about the preparation which contains a phenylalanine, a valine, a methionine, and an alanine on the same conditions as an example 1 except using the following as the carrier buffer solution.

** Carrier buffer solution : 100mM The borate buffer solution, a 60mM gamma-cyclodextrin, 100mM SDSs ** (pH 8.3) carrier buffer solution : 50mM phosphate buffer solution, 15mM(s) Optical-activity detergent (octyl-beta-D-thio glucoside), 20mM(s) SDS ** (pH 7.0) carrier buffer solution : [20mM phosphate buffer solution,] 20% The analysis result at the time of using the carrier buffer solution of a methanol, a 100mM beta-cyclodextrin, 5M urea, 60mM SDS ** (pH 7.0), **, and ** was shown in drawing 3 , drawing 4 , and drawing 5 , respectively. Even if the peak had come out so that more clearly than each analysis result, and, and (drawing 4) and the number of peaks were insufficient, or it was carrying out (drawing 5), and the gap was also unsuitable to analysis of the above-mentioned amino acid. [that separation is bad] [that (drawing 3) and separation are completely impossible]

[Translation done.]